

УДК 633.72:631.521

UDC 633.72:631.521

DOI 10.30679/2219-5335-2021-3-69-76-85

DOI 10.30679/2219-5335-2021-3-69-76-85

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО
РАЗНООБРАЗИЯ *IN VITRO*
СОМАКЛОНОВ ЧАЯ
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE)
МЕТОДАМИ SSR И ISSR АНАЛИЗА
ПОЛНОГЕНОМНОЙ ДНК***

**THE STUDY OF GENETIC
DIVERSITY *IN VITRO*
SOMATIC TEA CLONES
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE)
BY SSR AND ISSR METHODS
OF FULL GENOMIC DNA ANALYSIS***

Гвасалия Майя Валериановна
канд. биол. наук
ст. научный сотрудник
отдела биотехнологии растений
e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

Gvasaliya Maya Valerianovna
Cand. Biol. Sci.
Senior Research Associate
of Biotechnology Plant Department
e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

*Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Субтропический научный центр РАН»,
Сочи, Россия*

*Federal State Budgetary Institution
of Science, Federal Research Center
«Subtropical Scientific Center
of the Russian Academy of Sciences»,
Sochi, Russia*

В статье представлены результаты исследований по изучению изменчивости *in vitro* длительно культивируемых соматклонов, полученных через каллусную культуру чая. Генетическое разнообразие протестировано с использованием SSR и ISSR праймеров. Более высоким уровнем полиморфизма отличились мультилокусные ISSR праймеры (40–52 %). Выявлено наличие генетических дистанций между соматклонами и между каллусами, из которых они были получены, хотя коэффициент отличий был не столь значительным и составил 0,05–0,1. Все соматклоны разделились на три кластера. Некоторые образцы оказались идентичными, с нулевыми различиями. Наибольшая изменчивость из всей группы обнаружена у образца №16. Анализ структуры популяции соматклонов показал, что по частотам аллелей внутри исследуемой группы не имеется

The article presents the study of variability *in vitro* long-term cultivated somaclones, obtained through callus tea culture. Genetic diversity was tested using SSR and ISSR primers. The multilocus ISSR primers characterized by a higher level of polymorphism (40–52 %). The presence of genetic distances between somaclones and between calluses, from which they were obtained, was revealed, although the coefficient of differences was not so significant and amounted to 0,05–0,1. All somaclones had divided into three clusters. Some of the samples were identical, with zero differences. The highest variability of the whole group was detected in the sample №16. Analysis of somaclones population structure revealed that in the study

* Публикация подготовлена в рамках реализации ГЗ ФИЦ СЦ РАН № 0492-2021-0005 (Разработка методов биотехнологии для целей сохранения генетических ресурсов субтропических, плодовых, декоративных культур и видов природной флоры как источников ценных признаков и селекционных исследований)

* The publication was prepared within the framework of the implementation of the State Program of the Scientific Research Center of the Russian Academy of Sciences No. 0492-2021-0005 (Development of biotechnological methods for the conservation of genetic resources of subtropical, fruit, ornamental crops and species of natural flora as sources of valuable traits and breeding research)

выраженных популяций. Индуцированная из каллуса чая изменчивость носит точковый характер. Все аллели распределились в образцах примерно в равных долях. Средние дистанции между образцами в популяциях (ожидаемая гетерозиготность) оказались примерно одинаковыми и частоты аллелей составили 0,57, поэтому все предполагаемые популяции попали в один общий кластер. Каллус чая также показал низкий уровень полиморфизма ДНК, и низкий процент генетических различий с соматклонами, что подтверждает наличие точковой изменчивости. Отсутствовала корреляция между конкретным соматклоном и каллусом, из которого он был получен – кластеризация носила рандомный характер. SSR и ISSR анализ полногеномной ДНК показал, что амплифицированные SSR фрагменты отличались размером в пределах 10 пар нуклеотидов, гетерозигот в популяции детектировано не было. Структура популяции носила гомогенный характер с равным распределением частоты аллелей внутри популяции. В целом отмечен низкий процент генетических различий при соматклональной изменчивости чая.

Ключевые слова: ЧАЙ, СОМАКЛОНЫ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ, SSR И ISSR ПРАЙМЕРЫ, ПОЛИМОРФИЗМ, КЛАСТЕР, СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ

group populations have not expressed by the allele frequencies. The variability induced from the tea callus is of a point nature. All alleles were distributed in the samples in approximately equal proportions. The average distance between samples in the population (expected heterozygosity) were about the same, and the frequency of alleles was 0,57, so all possible populations fell into the same cluster. Tea callus also showed a low level of DNA polymorphism, and a low percentage of genetic differences with somaclones, which confirms the presence of point variation. There was no correlation between the specific somaclon and callus, from which it was obtained – the clustering was of a random nature. SSR and ISSR analysis of full genome DNA showed, that the amplified SSR fragments differed in size within 10 base pairs; heterozygotes were not detected in the population. The structure of the population was homogeneous with an equal distribution of allele frequencies within the population. On the whole, there were a low percentage of genetic differences in the somaclonal variability of tea.

Key words: TEA, SOMATIC CLONES, GENETIC VARIABILITY, SSR AND ISSR PRIMERS, POLYMORPHISM, CLUSTER, POPULATION STRUCTURE

Введение. Спонтанный мутагенез, возникающий в культуре *in vitro* позволяет проводить отбор новых форм, представляющих значительный интерес для пополнения генофонда растений чая [1, 2]. Изменчивость в культуре клеток является альтернативой индуцированному мутагенезу, не используя физические и химические мутагены, можно получить широкий спектр изменчивости как по фенотипу, так и генотипу [3, 4]. Основными фак-

торами, вызывающими мутации *in vitro*, являются: длительность выращивания в атипичных стрессовых условиях [5], генотип донорного экспланта, дисбаланс концентрации фитогормонов в питательной среде [6], использование каллусной ткани для органогенеза [7, 8]. Изменчивость *in vitro* проявляется в полиплоидии, анеуплоидии, хромосомных перестройках (дупликации, делеции, транслокации, инверсии); изменениях генов ядра и цитоплазмы, амплификацией и редукцией генов, активацией «спящих» генов и т.д. [9, 10]. Что касается культуры чая, то ее вариабельность *in vitro* связана с генетической и фенотипической гетерогенностью природных популяций. Разработка методов регенерации растений из соматических клеток в культуре *in vitro* и открытие соматической изменчивости выявили новые возможности для получения соматических клонов и соматических вариантов. Установить вариабельность и обосновать природу соматической изменчивости можно с помощью молекулярных маркеров, в частности ПЦР анализа [11, 12].

Объекты и методы исследований. Питательную среду готовили по прописи Мурасиге-Скуга, с использованием стандартных солей [13], рН устанавливали на уровне 5,8 путем добавления КОН (1 н.) или HCL (1 н.). Объектами исследований служили микропобеги чая местной популяции, полученные путем органогенеза из каллуса. На субкультивировании *in vitro* они находятся в течение 10 лет, в стеклянных сосудах, при 65-70 % относительной влажности, температурном режиме 25 ± 2 °С, освещении люминесцентными лампами дневного света (OSRAM L36W/765), фото-периодом 16/8 час. Полногеномную ДНК выделяли из листьев и каллусов методом ЦТАБ [14]. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом на приборе BioDrop μ Lite, качество ДНК оценивали методом электрофореза в 1 % агарозном геле. Амплификацию фрагментов ДНК проводили ПЦР анализом, с использованием 4 ISSR и 11 SSR маркеров. Объем реакционной смеси 25 мкл, из которых 12,5 мкл 2х-кратный ПЦР буфер

(Биолабмикс), содержащий Taq-ДНК-полимеразу горячего старта. ПЦР смесь для ISSR анализа содержала 0,7 мкл праймера (10 мкмоль), 3 мкл ДНК (концентрации 100 нг/мкл) и воду; ПЦР смесь для SSR-анализа содержала по 0,5 мкл праймера F и R, 1 мкл ДНК (концентрации 100 нг/мкл) и воду. Амплификацию проводили на приборах LightCycler 96 (Roche) и MiniAmp (Thermo Fisher Scientific). Программа амплификации для ISSR праймеров: преинкубация 5 мин. при 94 °С, денатурация 30 сек. при 94 °С, отжиг 40 циклов по 20 сек. при 52 °С и элонгация по 2 мин. при 72 °С с последующей финальной элонгацией 4 мин. при 72 °С. Программа амплификации для SSR праймеров: преинкубация 5 мин. при 94 °С, денатурация 30 сек. при 94 °С, отжиг 40 циклов по 15 сек. при 60 °С и элонгация 30 сек. при 72 °С с последующей финальной элонгацией 4 мин. при 72 °С. Продукты ПЦР визуализировали в 2 % агарозном геле с 1 × TAE буфером при напряжении 90 V и анализировали с использованием гель-документирующей системы BlueCube 300L (Serva). Анализ эффективности праймеров проводили методами, описанными в публикации Ю.В. Артемьева и А.М. Артемьевой [15]. Анализ структуры популяции и генетических примесей проводили с использованием программного обеспечения STRUCTURE ver. 2.3.4 [16], для надежности подтверждения популяционной структуры программу запускали по следующим параметрам: $K=3-15$, период burn-in 50,000 и 50,000 повторений Markov Chain Monte Carlo с использованием модели примесей и модели корреляции аллелей. Генетические дистанции определяли с использованием пакета Darwin ver.6,0 [17], дендрограмма была построена методом Neighbor joining [18]. Для модификации дендрограммы использовали программу Dendroscope ver.3.6.3 [19].

Обсуждение результатов. При изучении генетического разнообразия соматклонов чая выявлено, что все SSR праймеры показали отсутствие рецессивных аллелей – нулевой уровень гетерозиготности у всех образцов.

В целом, отмечен низкий уровень полиморфизма SSR праймеров, находящийся в пределах от 0 до 54 %. Наибольший полиморфизм отмечен у праймеров L40, L57, L07 и L20 и составил 54, 36, 36 и 34 % соответственно. Мультилокусные ISSR–праймеры показали более высокий уровень полиморфизма, который составил 0,40-0,52 (табл. 1). Низкий полиморфизм объясняется низким процентом генетического разнообразия в изучаемой популяции растений (рис. 1). Эти же праймеры показали более высокий уровень полиморфизма при генотипировании природных популяций и коллекций чая *in vivo*, что подтверждает существенно большую генетическую изменчивость между образцами в природных популяциях, чем изменчивость *in vitro*. Низкий уровень генетического полиморфизма отмечен также и в ДНК, выделенной из каллусной ткани.

Таблица 1 – Последовательность праймеров и уровень полиморфизма для анализа соматклонов чая *in vitro*

| Праймер | Последовательность, 5' – 3' | Температура отжига, °C | PIC |
|---------|---|------------------------|------|
| SSR L05 | F: AGGGGATGTAGATTGGTATG R: CACCTTTAGTTAGGCGGAAT | 60 | 0.00 |
| SSR L07 | F: TGTGGTTGGTCAAAAAGTAAG R: GGACCTCTTCTACTACCCAA | 60 | 0.36 |
| SSR L20 | F: GCTCCATAACAACCACCACT R: ATCACCACCATTCTATACCC | 60 | 0.34 |
| SSR L34 | F: TGCTGCCTAGAAAATGGACGG R: CAAATGCGAGACACCCTGCTTA | 60 | 0.16 |
| SSR L40 | F: TCCCTGTGCTGATACCTCTA R: TGTGATGTTGGCAGTTCTAT | 60 | 0.54 |
| SSR L52 | F: ATCATAGCAGACCAACGACT R: ACTGAAATCAGGCCAAAATC | 60 | 0.16 |
| SSR L57 | F: AAAGAGGCATCCATGAAAAC R: ACCAAAAACAGAGGGACAAA | 60 | 0.36 |
| SSR L60 | F: TTGCTCTCTCTTCCCTCCACC R: AGTCTCATTTCCTTCCCAGT | 60 | 0.10 |
| SSR L63 | F: GTGAAAGGAATGTGTAGTGG R: GAGGTGGTAGTTGTGTGGGT | 60 | 0.16 |
| SSR L67 | F: AATGCTAAGAAGAAGTGGGG R: GTGAAGGAAAAGTAACGGC | 60 | 0.29 |
| SSR L70 | F: TTACCGATCACAGGGGAAAA R: ACCATTGGGGATAGAAGGAG | 60 | 0.16 |
| ISSR-3 | CTCTCTCTCTCTCTT | 52 | 0.45 |
| ISSR-8 | GGAGAGGAGAGGAGA | 52 | 0.52 |
| ISSR-9 | ACACACACACACACC | 52 | 0.40 |
| ISSR-10 | TGTGTGTGTGTGTGG | 52 | 0.42 |

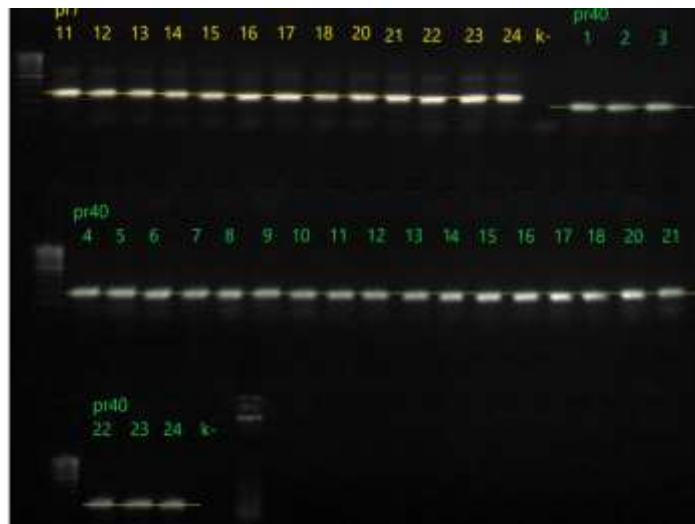


Рис. 1. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов соматклонов чая

Однако, несмотря на низкий полиморфизм амплифицированных фрагментов, нами было выявлено наличие генетических различий между соматклонами и между каллусами, из которых они были получены, хотя коэффициент отличий был не высокий и составил 0,05-0,1 (рис. 2).

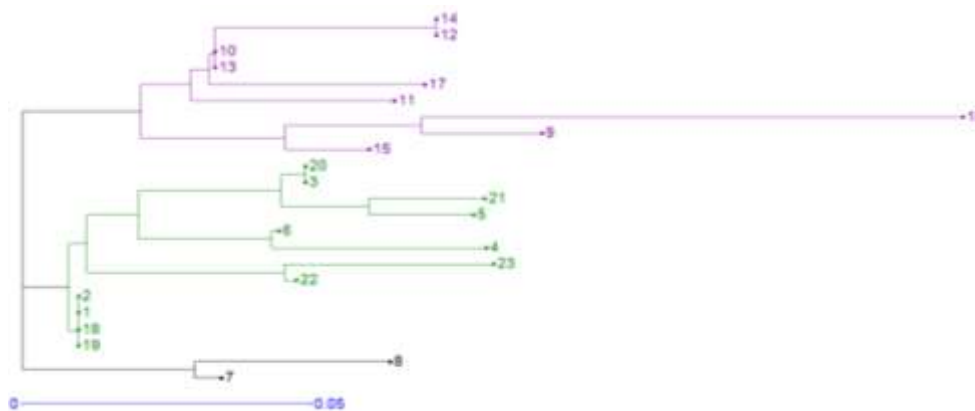


Рис. 2. Дендрограмма генетических дистанций соматклонов, полученных из каллуса чая *in vitro*

Все соматклоны, включенные в эксперимент, разделились на три кластера. Некоторые образцы оказались идентичны друг другу: 14 и 12; 10 и 13; 1, 2, 18 и 19 – с нулевыми генетическими дистанциями между ними. Наибольшая изменчивость из всей группы обнаружена у образца под номером 16.

Анализ структуры популяции соматклонов подтвердил, что по частотам аллелей внутри исследуемой группы не имеется выраженных популяций, нет

подразделения на кластеры (рис. 3), что подтверждает предположение о том, что индуцированная из каллуса чая изменчивость носит точковый характер. Доля аллелей от каждой из пяти ($K = 5$) предполагаемых популяций в каждом образце составила 0,198-0,203, то есть все аллели распределились в образцах примерно в равных долях. Средние дистанции между образцами в популяциях (ожидаемая гетерозиготность) оказались примерно одинаковыми и частоты аллелей составили 0,57, поэтому все предполагаемые популяции попали в один общий кластер. При изменении предполагаемого значения K результаты не менялись, выраженной кластеризации популяций получено не было.

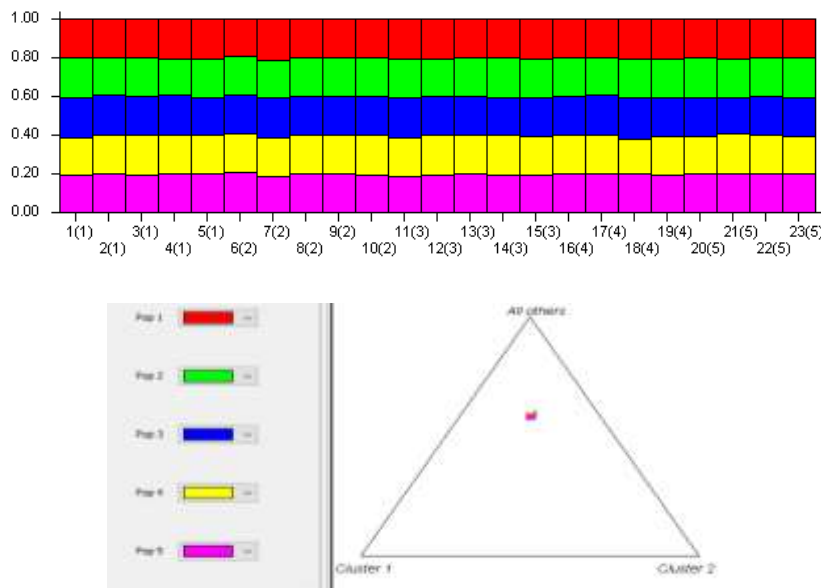


Рис. 3. Генетическая структура популяции 23-х соматклонов чая *in vitro*

Каллус чая также показал низкий уровень полиморфизма ДНК и низкий процент генетических различий с соматклонами, что подтверждает наличие точковой изменчивости в микропобегах, индуцированных из каллуса чая. Было выявлено отсутствие тесной корреляции конкретного соматклона и каллуса, из которого он получен – кластеризация соматклонов и каллусов носила случайный характер (рис. 4).

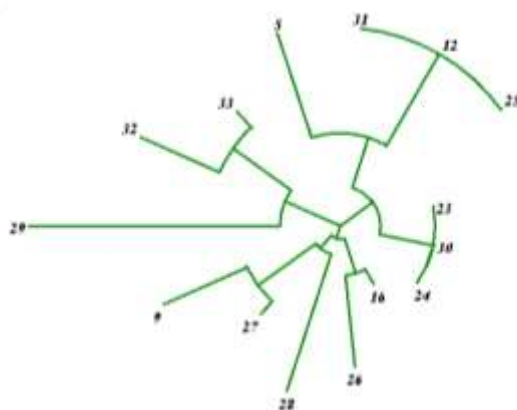


Рис. 4. Дендрограмма генетических дистанций в базальных каллусах чая в сравнении с соматклонами, полученными из них (27,29,32,33,30 – каллусы)

Из пяти каллусных образцов, первые три (29, 32, 33) сгруппировались в отдельный кластер, четвертый (27) попал в кластер с пятью соматклонами, и пятый (30) генетически идентичен с двумя соматклонами. Следует отметить, что каллус для анализа был получен в базальной части конкретных соматклонов: 27 = соматклон № 5, 29 = соматклон № 9, 32 = соматклон № 12, 33 = соматклон №16, 30 = соматклон № 33. Но кластеризация их носила случайный (случайный) характер, и корреляции между конкретным образцом каллуса и соматклоном, от которого он был получен, выявлено не было. Хотя следует отметить главный факт – очень маленький размер генетических дистанций между всеми исследуемыми образцами, что показала кластеризация с шагом 0,01.

Заключение. В результате изучения генетического разнообразия соматклонов чая, размноженных *in vitro* методами SSR и ISSR анализа полногеномной ДНК было выявлено, что амплифицированные SSR фрагменты отличались размером в пределах 10 пар нуклеотидов, гетерозигот в популяции детектировано не было. Структура популяции носила гомогенный характер с равным распределением частоты аллелей внутри популяции. Результаты наших исследований показали сравнительно низкий процент генетических различий при соматклональной изменчивости чая.

Литература

1. Кунах В.А. Эволюция клеточных популяций *in vitro*: особенности, механизмы, движущие силы и следствия // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: сборник тезисов X междунар. конф. (Казань, 14-18 октября 2013 г.). Казань, 2013. С. 47-49.
2. Лебедев В.Г., Азарова А.Б., Шестибратов К.А., Деменко В.И. Проявление соматоклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений // Известия ТСХА. 2012. Вып. 1. С. 153-163.
3. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений. Минск. БГУ, 2007. 102 с.
4. Леонова Н.С. Изменчивость в культуре картофеля (*Solanum tuberosum* (L.) *in vitro* и возможности её использования в селекции и семеноводстве: автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.06 / Леонова Нина Семеновна. Улан-Удэ, 2010. 32 с.
5. Влияние стрессов на генетическую изменчивость культивируемых тканей растений / Ю.И. Долгих [и др.] // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: сборник тезисов X междунар. конф. (Казань, 14-18 октября 2013 г.). Казань, 2013. С. 64.
6. Rakoczy Trojanowska M. The effect of growth regulators on somaclonal variation in rye *Secale cereal* (L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits // Cell Mol. Biol., 2002. – V.7. – P. 1111-1120.
7. Катасонова А.А. Морфогенетические очаги в каллусной культуре *in vitro* зародышей пшеницы // Современные микроскопические исследования в биологии и медицине. М.: Лабора, 2006. С. 28-29.
8. Nehra N.S., Kartha K.K., Stushnott C., Giles K.L. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry // Plant Cell Tissue Organ Culture, 1992. – V.29. – P. 257-268.
9. Nontaswatsri C., Fukai S. Regenerative callus of *Dianthus* 'Telstar Scarlet' showing mixoploidy produce diploid plants // Plant Cell Tissue Organ Culture, 2005. – V.83. –P. 351-355.
10. Kumar P.S., Mathur V.L. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum* // Plant Cell Tissue Organ Culture, 2004. – V.78. – P. 267-271.
11. Chen L., Zhao L.P., Ma C.L., Liu Z., Zhang Y.L. Recent progress in the molecular biology of tea (*Camellia sinensis*) based on the expressed sequence tag strategy: A review // Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2009. – V.84. – №5. – P. 476-482.
12. Осипова Е.С. Вариабельность ДНК-маркеров (RAPD, ISSR) при соматоклональной изменчивости у кукурузы: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.12 / Осипова Екатерина Сергеевна. М., 2003. 26 с.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum, 1962. – V.15. – № 3. – P. 473-497.
14. Doyle, J.J., Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – V.12. – P. 13-15.
15. Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия // Сельскохозяйственная биология, 2015. Т. 50. № 5. С. 571-578.
16. Pritchard J., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics, 2000. – №155. – P. 945-959.
17. Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>. – 2006.
18. Gascuel O., Steel M. Neighbor-Joining Revealed // Molecular Biology and Evolution, 2006. – V.23. – №11. – P.1997-2000.
19. Huson D., Richter D., Rausch C., DeZulian T. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees // BMC Bioinformatics, 2007. – №8. – 460 p.

References

1. Kunah V.A. Evolyuciya kletочnyh populyacij *in vitro*: osobennosti, mekhanizmy, dvizhushchie sily i sledstviya // *Biologiya kletok rastenij in vitro i biotekhnologiya: sbornik tezisov X mezhdunar. konf. (Kazan', 14-18 oktyabrya 2013 g.)*. Kazan', 2013. S. 47-49.
2. Lebedev V.G, Azarova A.B., Shestibratov K.A., Demenko V.I. Proyavlenie somaklonal'noj izmenchivosti u mikrorazmnozhenykh i transgennykh rastenij // *Izvestiya TSHA*. 2012. Vyp. 1. S. 153-163.
3. Ditchenko T.I. Kul'tura kletok, tkanej i organov rastenij. Minsk. BGU, 2007. 102 s.
4. Leonova N.S. Izmenchivost' v kul'ture kartofelya (*Solanum tuberosum* (L.) *in vitro* i vozmozhnosti eyo ispol'zovaniya v selekcii i semenovodstve: avtoref. dis. ...d-ra biol. nauk : 03.01.06 / Leonova Nina Semenovna. Ulan-Ude, 2010. 32 s.
5. Vliyanie stressov na geneticheskuyu izmenchivost' kul'tiviruemykh tkanej rastenij / Yu.I. Dolgih [i dr.] // *Biologiya kletok rastenij in vitro i biotekhnologiya: sbornik tezisov X mezhdunar. konf. (Kazan', 14-18 oktyabrya 2013 g.)*. Kazan', 2013. S. 64.
6. Rakoczy Trojanowska M. The effect of growth regulators on somaclonal variation in rye *Secale cereal* (L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits // *Cell Mol. Biol.*, 2002. – V.7. – P. 1111-1120.
7. Katasonova A.A. Morfogeneticheskie ochagi v kallusnoj kul'ture *in vitro* zarodyshej pshenicy // *Sovremennye mikroskopicheskie issledovaniya v biologii i medicine*. M.: Labora, 2006. S. 28-29.
8. Nehra N.S., Kartha K.K., Stushnott C., Giles K.L. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry // *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1992. – V.29. – P. 257-268.
9. Nontaswatsri C., Fukai S. Regenerative callus of *Dianthus* 'Telstar Scarlet' showing mixoploidy produce diploid plants // *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2005. – V.83. –P. 351-355.
10. Kumar P.S., Mathur V.L. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum* // *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2004. – V.78. – P. 267-271.
11. Chen L., Zhao L.P., Ma C.L., Liu Z., Zhang Y.L. Recent progress in the molecular biology of tea (*Camellia sinensis*) based on the expressed sequence tag strategy: A review // *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2009. – V.84. – №5. – P. 476-482.
12. Osipova E.S. Variabel'nost' DNK-markerov (RAPD, ISSR) pri somaklonal'noj izmenchivosti u kukuruzy: avtoref. dis. ...kand. biol. nauk : 03.00.12 / Osipova Ekaterina Sergeevna. M., 2003. 26 s.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*, 1962. – V.15. – № 3. – P. 473-497.
14. Doyle, J.J., Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. – 1990. – V.12. – P. 13-15.
15. Chesnokov Yu.V., Artem'eva A.M. Ocenka mery informacionnogo polimorfizma geneticheskogo raznoobraziya // *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*, 2015. T. 50. № 5. S. 571-578.
16. Pritchard J., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*, 2000. – №155. – P. 945-959.
17. Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>. – 2006.
18. Gascuel O., Steel M. Neighbor-Joining Revealed // *Molecular Biology and Evolution*, 2006. – V.23. – №11. – P.1997-2000.
19. Huson D., Richter D., Rausch C., DeZulian T. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees // *BMC Bioinformatics*, 2007. – №8. – 460 p.